

ヒト大腸癌におけるp62/sequestosome 1の発現および機能の解析

著者	中山 瞬
号	83
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3264号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58015

氏 名	ナカヤマ シュン 中山 瞬
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 26 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医学科専攻
学位論文題目	ヒト大腸癌における p62/sequestosome 1 の発現および機能の解析
論文審査委員	主査 教授 海野 倫明 教授 笹野 公伸 教授 今谷 晃 教授 仁尾 正記

論 文 内 容 要 旨

p62/sequestosome 1 (p62)は、ユビキチン化基質を選択的に分解する選択的オートファジーを担うとともに、様々なシグナル伝達系にスカフォールドタンパクとして作用する複数のドメインを持つレセプタータンパクである。p62 は胃癌、大腸癌、肝細胞癌、肺癌、前立腺癌、乳癌など多くのヒトの悪性腫瘍において高発現していることが近年明らかになってきているが、大腸癌におけるその生物学的役割や重要性は明らかになっていない。

大腸癌 118 例および大腸腺腫 28 例の手術検体を用いて、p62 の免疫組織化学を行い、臨床病理学的検討を加えた。さらに 4 種類の大腸癌細胞株 (HCT8、HT29、COLO320、SW480) を用いて、*in vitro* での p62 の機能解析を行った。

免疫組織化学において、p62 は腫瘍細胞の細胞質に発現しており、p62 陽性は大腸腺腫症例の 11%、大腸癌症例の 31%にみられた。一方、非腫瘍性上皮には p62 の発現はみられなかった。p62 陽性例では同時性肝転移が有意に多く、p62 陽性は全生存期間における多変量解析では独立した予後不良因子であった。

HCT8、HT29 において 2 種類の p62 特異的 Small interfering RNA (siRNA)を用いて p62 の発現抑制を行うと、細胞増殖能は有意に低下した。一方、HCT8、HT29 を用いた創傷治癒アッセイによる検討では、p62 発現抑制と細胞遊走能との間には関連はみられなかった。また、COLO320、SW480 において HA-tagged p62 発現プラスミドを用いた p62 の過剰発現を行うと細胞増殖能は有意に亢進した。さらに、オートファジー阻害剤 bafilomycin A1 投与下でも p62 の発現抑制により細胞増殖能は有意に低下した。さらに、monomeric red fluorescence protein (mRFP)-green fluorescent protein (GFP) tandem fluorescent-tagged microtubule-associated protein 1 light chain 3 (tfLC3) 発現プラスミドを p62 特異的 siRNA と同時に HCT8、HT29 に導入し、共焦点顕微鏡を用いた蛍光観察にてオートファジーフラックスを観察したところ、p62 発現抑制とオートファジー活性には関連はみられなかった。

本研究は大腸癌患者における p62 陽性が独立した予後不良因子であることを示した初めての報告である。さらに、ヒトの大腸腺腫細胞においてはこれまで p62 の発現は報告されておらず、本研究が初の報告となる。*in vitro* の実験では、p62 は大腸癌細胞株の細胞増殖能をオートファジー非依存性に促進しており、p62 が主にシグナル伝達系を介してスカフォールドタンパクとし

(書式12)

て作用することにより細胞増殖能を促進することが示唆された。しかし、大腸癌においては p62 がどのようなシグナル伝達系を介して作用するかは明らかになっておらず、さらなる検討が必要と考えられた。過去の報告からも、p62 は悪性腫瘍において、細胞増殖能を亢進させるだけでなく、腫瘍の浸潤、転移や抗癌剤耐性などに関する様々な生物学的機能を担う可能性が示唆される。p62 は大腸癌患者の予後予測因子になるだけでなく、今後さらなる p62 の機能解析が進めば、p62 を標的とした治療への応用の可能性もあると考えられた。

審査結果の要旨

博士論文題目 ヒト大腸癌における p62/sequestosome 1 の発現および機能の解析

所属専攻・分野名 医科学専攻 消化器外科学 分野

氏名 中山 瞬

選択的オートファジーを含めた複数の作用を有する p62 に着目し、大腸癌におけるその重要性や生物学的役割を明らかにすることを目的に行われた研究であり、まずは臨床的な観点から、大腸癌および大腸腺腫の手術検体を用いて p62 の免疫組織化学を行い、臨床病理学的検討が加えられた。免疫組織化学において、腫瘍細胞の細胞質で p62 の発現が観察され、p62 陽性例では同時性肝転移が有意に多いこと、全生存期間における多変量解析では p62 陽性は独立した予後不良因子であることが示された。これは、p62 が大腸癌患者の予後予測因子となりえることを示す貴重な研究成果である。

次に 4 種類の大腸癌細胞株（HCT8、HT29、COLO320、SW480）を用いた p62 の機能解析が行われ、Small interfering RNA による p62 発現抑制やプラスミドによる p62 強制発現を用いて、*in vitro* で p62 が細胞増殖能に関与していることが示された。これらの p62 の機能がオートファジーを介したものであるかを明らかにするため、オートファジー阻害剤を用いた検討が行われ、p62 による細胞増殖能の変化はオートファジー非依存性であることが明らかにされた。さらに、これらの結果を裏付けるため、共焦点顕微鏡を用いた蛍光観察による最新の手法である tfLC3 を用いた検討により、p62 発現とオートファジー活性には関連がみられないことが示された。文献的考察を含め、p62 は悪性腫瘍において細胞増殖能を亢進させるだけでなく、腫瘍の浸潤、転移など多様な役割を担う可能性が示唆された。これらの結果から、将来的には p62 を標的とした治療への応用の可能性もあると考えられた。

本研究では、ヒト大腸癌における p62 の発現と、臨床病理学的因子との相関について解析し、肝転移や予後との間に関連性を見出し、さらに大腸癌細胞株を用いた解析により p62 はオートファジー非依存性に細胞増殖能に関与していることが明らかにされている。十分な症例数に基づく予後の解析に、*in vitro* での多角的な検討が加えられ、新たな知見を得ていることから、十分に学位に値すると判断される。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。